

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии гена Российской академии наук
(ИБГ РАН)

Вавилова ул., 34/5, Москва, 119334

Тел.: (499)135-60-89, (499)135-98-84 Факс: (499)135-41-05

e-mail: info@genebiology.ru; <http://www.genebiology.ru>

ОКПО 00244660 ОГРН 1027739618037 ИНН/ КПП 7736020369/773601001

06 мая 2026 № 72318-86

На № от



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ИБГ РАН

академик РАН Георгиев П.Г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Гильванова Айдара Римовича
«Флуоресцентная время-разрешенная микроскопия с применением
флуорогенных красителей арилиден-азолонового ряда»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.3 Молекулярная биология

Актуальность темы исследования. Диссертационная работа Айдара Римовича Гильванова посвящена разработке новых методов мультиплексной микроскопии для анализа процессов, происходящих в живых клетках. В последние годы большой интерес у научного сообщества вызывает новый класс химических меток – флуорогенные красители. Флуоресцентная время-разрешенная микроскопия (FLIM) является методом микроскопии, позволяющим детектировать несколько близких по спектру флуоресцентных меток в одном спектральном канале по времени жизни флуоресценции. Данный метод позволяет получать значительно больше информации в рамках одного эксперимента. Применение нескольких спектральных каналов позволяеткратно увеличить объем получаемых данных. Актуальной задачей развития данного подхода является совершенствование уже существующих и разработка новых систем для

множественного мечения при использовании FLIM. Работа А.Р. Гильванова направлена на разработку новых систем для множественного мечения для FLIM, основанную на применении арилиден-азолоновых флуорогенных красителей, в том числе, в виде комплексов с флуороген-активирующим белком FAST и его вариантами.

Для решения этой проблемы автором были сформулированы следующие задачи:

1. Изучить возможность применения арилиден-имидазолоновых «сенсоров полярности» во время-разрешенной микроскопии (FLIM) живых клеток млекопитающих;

2. Изучить возможность применения комплексов вариантов флуороген-активирующего белка FAST с точечными заменами и красителей арилиден-азолонового ряда, обладающих эмиссией в зелено-оранжевой области (500-600 нм) видимого спектра в мультиплексной время-разрешенной микроскопии;

3. Изучить возможность применения комплексов вариантов флуороген-активирующего белка FAST с точечными заменами и флуорогена N871b, обладающих эмиссией в оранжево-красной области (600-650 нм) видимого спектра в мультиплексной время-разрешенной микроскопии;

4. Изучить возможность применения комплексов вариантов флуороген-активирующего белка FAST с точечными заменами и флуорогена MMV32.4, обладающих эмиссией в дальне-красной области (650-700 нм) видимого спектра в мультиплексной время-разрешенной микроскопии.

Обоснование темы и задач работы логичны и не вызывают сомнений.

Автор комплексно подошел к решению поставленных задач настоящей работы, используя разнообразные современные молекулярно-биологические подходы, спектральные методы, время-разрешенную лазерную конфокальную микроскопию, а также методы анализа изображений и обработки сигналов затухания флуоресценции.

Научная новизна исследования и полученных результатов. В работе А.Р. Гильванова впервые продемонстрированы возможности применения флуорогенных красителей ряда арилиден-азолонов во FLIM. Автором показана возможность применения FLIM для разделения сигналов от меченых «сенсорами

полярности» эндоплазматического ретикулума и адипосом. В рамках данной работы автор использовал панель арилиден-азолоновых флуорогенных красителей в комплексе с вариантами флуороген-активирующего белка FAST, содержащими точечные аминокислотные замены.

Теоретическое и практическое значение работы. На примере FLIM клеток HeLa Kyoto автором показано, что комбинация мутантных вариантов белка FAST с различными флуорогенными красителями может быть использована для множественного мечения внутриклеточных структур живых клеток. Панель применяемых автором флуорогенных лигандов для белка FAST охватывает спектральный диапазон 500-700 нм, что позволяет использовать комплексы FAST:флуороген в разных спектральных каналах. Учитывая, что времена жизни флуоресценции большинства комплексов FAST:флуороген стабильны в ряде внутриклеточных структур (ядро, митохондрии, виментин), полученные результаты уже могут применяться в мультиплексной FLIM-микроскопии.

Обоснованность и достоверность полученных результатов. Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне. Для решения поставленных задач был использован большой набор современных молекулярно-биологических подходов, различных спектральных методов, время-разрешенная конфокальная микроскопия, обработка и анализ изображений и времен жизни флуоресценции. Научные положения, сформулированные автором в диссертации, основаны на изучении достаточного объема экспериментального материала. Часть полученного экспериментального материала вынесена в приложения, которые могут быть полезны в качестве справочного материала для дальнейших работ в данном направлении. Научные положения и выводы аргументированы и базируются на согласованных данных теоретических и экспериментальных исследований. Данные основных положений диссертации опубликованы в рецензируемых научных журналах и представлены на конференции.

Личный вклад автора. Основные результаты работы представлены в 5 статьях в рецензируемых научных изданиях, в четырех из которых А.Р. Гильванов является первым автором, что подтверждает как значимость проведенных исследований, так и его личный вклад. В работе отмечается, что эксперименты с FLIM были выполнены совместно с коллегами из лабораторий А.П. Савицкого

(ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии РАН», Москва) и Е.Г. Максимова (МГУ имени М. В. Ломоносова, Москва).

Объем и содержание работы. Текст диссертационной работы изложен на 138 страницах, содержит 53 рисунка, 14 таблиц, 244 ссылки на литературные источники, к тексту приложены также 2 приложения на 6 страницах. Работа построена по стандартной схеме, содержит введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы.

Во введении автор обосновывает актуальность исследования, освещает степень разработанности и научную новизну темы диссертационной работы. Автором корректно сформулированы цель и задачи исследования, а также положения, выносимые на защиту. Данный раздел диссертационного исследования находится в соответствии с выводами работы, сформулированными на основе полученных автором результатов.

Обзор литературы разделен на четыре тематических блока. Первый блок посвящен краткому описанию основных характеристик явления флуоресценции. Во втором блоке автор описывает основные механизмы возникновения флуоресценции сольватохромных и флуорогенных красителей. Третий, наиболее объемный блок, посвящен рассмотрению различных классов генетически-кодируемых меток и особенностям их применения во FLIM. Особое внимание в данном блоке уделяется флуороген-активирующему белку FAST, его модификациям и особенностям применения. В четвертом блоке автором рассмотрены основные особенности применения методики FLIM. В целом, литературный обзор дает достаточно хорошее представление о тематике исследования. Представленный в обзоре литературы подробный анализ литературных источников указывает на тщательную проработку автором опубликованных данных. Обзор написан хорошим литературным языком и хорошо иллюстрирован.

Глава «**Материалы и методы**» содержит достаточно подробную информацию о применяемых молекулярно-биологических методах и методах работы с культурами эукариотических клеток. Также приведено описание методов

спектрометрии и флуоресцентной микроскопии, детально описаны протоколы обработки полученных микрофотографий.

Глава **«Результаты и обсуждение»** содержит описание полученных результатов и их интерпретацию с кратким заключением по каждому подразделу. В первую очередь, автор приводит результаты, полученные в процессе FLIM-микроскопии живых клеток HeLa Kyoto с арилиден-имидазолоновыми красителями, чувствительными к среде и окрашивающими эндоплазматический ретикулум и липидные капли (адипосомы). Показано, что в двух случаях разница во временах жизни флуоресценции позволяет разделять области, соответствующие указанным структурам. Основная часть главы посвящена последовательному описыванию результатов, полученных с применением комплексов мутантных вариантов белка FAST и арилиден-азолоновых флуорогенов, эмиссия которых находится в трех спектральных областях, обозначенных автором как зелено-оранжевая (500-600 нм), оранжево-красная (600-650 нм) и дальне-красная (650-700 нм). Автором показано, что разница во временах жизни флуоресценции применяемых комплексов FAST:флуороген позволяет точно и корректно разделять три меченые внутриклеточные структуры в зелено-оранжевой и оранжево-красной спектральной областях и две внутриклеточные структуры в дальне-красной спектральной области. Последнее особенно актуально при работе с живыми клетками, в виду меньшей для них фототоксичности. Большинство комплексов FAST:флуороген обладает достаточно стабильными временами жизни флуоресценции в различных внутриклеточных структурах (ядро, виментин, митохондрии), что имеет критическое значение для практики и позволяет использовать данные комплексы как готовый инструмент для FLIM-микроскопии.

В **«Заключении»** подведены итоги проведенного исследования и кратко описаны перспективы дальнейшего развития направления.

Диссертация завершается **выводами**, полученными в результате исследования. Раздел содержит 5 выводов, которые представляют основные результаты проведенных исследований. Формулировка выводов не вызывает серьезных нареканий. Заключение и выводы сформулированы грамотно, соответствуют поставленным задачам и положениям, выносимым на защиту,

отражают ключевые результаты и полностью отвечают поставленным задачам и цели.

Список литературы содержит ссылки на 244 литературных источника, что свидетельствует о широте проведенного анализа и осведомленности о последних достижениях в области флуоресцентной микроскопии.

В целом, диссертация А.Р. Гильванова хорошо написана, производит положительное впечатление и является цельным завершенным исследованием. Незначительные недоработки в тексте невелики и не снижают очевидной ценности работы.

Замечания:

К незначительным недостаткам работы относится не всегда корректное употребление биологических терминов:

1. На странице 25 используется некорректное употребление термина пролиферация по отношению к репродукции вирусов.

2. На странице 71 отмечается, что «ЭПР представляет собой клеточную органеллу, состоящую из сети полостей и трубочек, отделенную липидной мембраной от цитоплазмы...». ЭПР представляет собой часть цитоплазмы, поэтому в данном случае правильно было бы указать вместо «цитоплазма» другой термин: «цитозоль» или «гиалоплазма».

Кроме этого нужно отметить что:

3. На странице 74 указанные в таблицах 3.3. и 3.4 квантовые выходы флуоресценции двух разных соединений A1445 и SA440 идентичны для каждого из всех приведенных растворителей, что, возможно, является опечаткой.

4. В таблице 3.5 при сравнении параметров затухания флуорофоров напрашивается статистическая оценка полученных данных. Это сделало бы последующие выводы более весомыми.

Заключение

Результаты диссертационной работы Гильванова А.Р. могут быть использованы в молекулярно-биологических исследованиях, проводимых в ряде институтов Российской академии наук, в том числе: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук и ряде других учреждений.

Диссертационная работа А.Р. Гильванова «Флуоресцентная время-разрешенная микроскопия с применением флуорогенных красителей арилиден-азолонового ряда», является законченной научно-квалификационной работой. По содержанию, актуальности, новизне, научному и методическому уровню, научно-практической значимости полученных результатов, диссертационная работа Гильванова Айдара Римовича «Флуоресцентная время-разрешенная микроскопия с применением флуорогенных красителей арилиден-азолонового ряда» полностью соответствует критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), а сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Отзыв о диссертационной работе Айдара Римовича Гильванова на тему «Флуоресцентная время-разрешенная микроскопия с применением флуорогенных красителей арилиден-азолонового ряда» был обсужден и одобрен на семинаре лаборатории молекулярной генетики внутриклеточного транспорта Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук 6 мая 2026 года, протокол № 1 от 06.05.2026 г.

Ведущий научный сотрудник
лаборатории молекулярной
генетики внутриклеточного транспорта
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биологии гена Российской академии наук,
доктор биологических наук

РОЗЕНКРАНЦ Андрей Александрович

Контактная информация:

Адрес: 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5.

Телефоны: +7 (499) 135 3100 (рабочий), 7 (915) 196 5580 (мобильный).

Электронная почта: aar@genebiology.ru

